



北海道公立大学法人
札幌医科大学
Sapporo Medical University

SAPPORO MEDICAL UNIVERSITY INFORMATION AND KNOWLEDGE REPOSITORY

Title 論文題名	Transient Gene Expression Changes in Motor Cortex after Intravenous Infusion of Mesenchymal Stem Cells in a rat model of Acute Spinal Cord Injury (急性期脊髄損傷ラットモデルに対する骨髄間葉系幹細胞の経静脈的移植後の大脳皮質運動領域における一過性遺伝子発現の変化の検討)
Author(s) 著 者	押切, 勉
Degree number 学位記番号	甲第 3014 号
Degree name 学位の種別	博士 (医学)
Issue Date 学位取得年月日	2018-03-31
Original Article 原著論文	札幌医学雑誌 第 87 巻 第 1 号 (平成 31 年 3 月) 掲載予定
Doc URL	
DOI	
Resource Version	Author Edition

学位論文の内容の要旨

報 告 番 号	甲第 3014 号	氏 名	押切 勉
<p>論文題名</p> <p>Transient Gene Expression Changes in Motor Cortex after Intravenous Infusion of Mesenchymal Stem Cells in a rat model of Acute Spinal Cord Injury</p> <p>急性期実験的脊髄損傷に対する骨髄間葉系幹細胞の経静脈的移植後の大脳皮質運動野における一過性遺伝子発現変化の検討</p> <p>研究目的</p> <p>実験的脊髄損傷(spinal cord injury: SCI)モデルに対する骨髄間葉系幹細胞(Mesenchymal Stem Cell; MSC)の経静脈内投与による機能回復が数多く報告されている。MSC による機能回復に関与する多くのメカニズムのなかには、大脳皮質運動野における神経細胞の保護があることが知られている。本研究は、急性期 SCI ラットに MSC の経静脈的投与を行い、大脳皮質運動野の脳組織に対して、Microarray による網羅的遺伝子発現解析を行うことで、脳における機能回復の詳細なメカニズムを解明することを目的とした。</p> <p>研究方法</p> <p>第 9 胸髄レベルの SCI 圧挫損傷ラットモデルを作成し、損傷 24 時間後に治療群は MSC1.0×10^6 cells/cc を、対象群は培養液 1cc を経静脈的に投与した。移植 3 日目に大脳皮質運動野の脳組織から mRNA を抽出し Microarray 解析を行った。MSC による発現変動遺伝子(differentially expressed genes: DEGs)に対して real time PCR による validation を行った。DEGs の分子機能解析のため、Clue GO(Gene Ontology)解析および Interactome 解析を行った。細胞分化に関与する promoter 領域 (NR5F, PPARγ)と DEGs の転写配列に着目し、DEGs の発現量の変化について検討した。行動学的評価に Basso–Beattie–Bresnehan (BBB) score を用い、DEGs と BBB score との相関および Gene Set Enrichment Analysis(GSEA)を行った。移植 7 日目の PCR を行い DEGs の遺伝子発現量の経時的な変化を評価した。</p> <p>研究成績及び考察</p> <p>Microarray 解析(68,842 遺伝子)から DEGs 38 遺伝子が同定され、うち 15 coding 遺伝子 (up:7, down:8)を PCR により validation した。Clue GO 解析および Promoter 解析から神経保護および神経再生作用が示唆された。GSEA を用いて DEGs 遺伝子発現量と BBB</p>			

score に相関を認め、PCR により確認した。Day3 で得られた DEGs は Day7 の PCR では発現量の変化が減少しており、一過性の遺伝子発現の変化であることがわかった。

結論

MSC 移植後 SCI ラットモデルから採取した脳組織を用いた Microarray 解析を行った。得られた DEGs は神経保護および神経再生作用を有しており、さらに BBB と関連していたことから運動機能回復に関与していることが示唆された。MSC は経静脈的な全身投与により、損傷脊髄局所だけでなく脳に対しても作用していたことから、本研究で得られた DEG は移植後早期の機能回復に関与するメカニズムの分子基盤と考えられた。

論文審査の要旨及び担当者

平成 30 年 3 月 5 日提出

(平成 30 年 3 月 31 日授与)

報告番号	甲第 3014 号	氏 名	押切 勉
論文審査 担 当 者	主査 山下 敏彦	副査 本望 修	
	副査 長峯 隆	委員 藤宮 峯子	

論文題名	Transient Gene Expression Changes in Motor Cortex after Intravenous Infusion of Mesenchymal Stem Cells in a rat model of Acute Spinal Cord Injury (急性期実験的脊髄損傷に対する骨髄間葉系幹細胞の経静脈的移植後の大脳皮質運動野における一過性遺伝子発現変化の検討)
<p>結果の要旨</p> <p>本研究では、MSC 移植後早期の機能回復のメカニズムの解明のため、脊損ラットに対する MSC 移植後の脳のマイクロアレイ解析による網羅的遺伝子解析を行った。SD ラットの Th9 レベルに圧座モデルを作成し、損傷翌日に MSC または fresh-DMEM を大腿静脈から投与した。移植後 3 日目に大脳皮質運動野から total RNA を抽出した。マイクロアレイ解析の結果、発現変動遺伝子(DEG)で coding gene15 遺伝子(up:7, down:8)が抽出され、PCR validation により再現性を確認した。Clue GO 解析、Interactome 解析、Prometer 解析により、DEG による脳の神経再生作用および神経保護作用が示唆された。GSEA 解析の結果、MSC の治療効果と運動機能回復に関連が強く、共通する遺伝子として up-regulate gene の 4 つの遺伝子において遺伝子発現量と BBB score で強い正の相関を認めた。また、DEG の経時的变化を day7 の qRT-PCR で確認したところ遺伝子発現量の変化が正常化することから、一過性の遺伝子発現量の変化であることがわかった。MSC の経静脈的な全身投与により、損傷脊髄局所だけでなく脳に対しても作用することが、移植後早期の機能回復に関与するメカニズムと考えられた。</p> <p>以上の研究・質疑応答の結果を踏まえ、4 名の審査員から本論文は医学博士の論文に値すると評価された。</p>	